

1636 0420  
#5  
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

ZANDER

Serial No. 09/836,602

Filed: April 18, 2001

For: USE OF CD34 OR A POLYPEPTIDE DERIVED  
THEREFROM AS CELL-SURFACE OR GENE-  
TRANSFER MARKER

\* \* \* \* \*



Atty. Ref.: 35-204

Group:

Examiner:

RECEIVED

JUN 0 8 2001

TECH CENTER 1600/2900

June 1, 2001

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS**

Sir:

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

Application No.

100 19 075.8

Country of Origin

GERMANY

Filed

18 April 2000

Respectfully submitted,

**NIXON & VANDERHYE P.C.**

By: \_\_\_\_\_

B. J. Sadoff

Reg. No. 36,663

BJS:eaw  
1100 North Glebe Road, 8th Floor  
Arlington, VA 22201-4714  
Telephone: (703) 816-4000  
Facsimile: (703) 816-4100

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED

JUN 0 8 2001

TECH CENTER 1600/2900

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 19 075.8

**Anmeldetag:** 18. April 2000

**Anmelder/Inhaber:** Prof. Dr. Axel R. Z a n d e r , Ahrensburg/DE

**Bezeichnung:** Verwendung von CD34 oder einem davon abgeleiteten Polypeptid als Zell-Oberflächen- bzw. Gentransfer-Marker

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. April 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Agurks

**UEXKÜLL & STOLBERG**

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4  
D-22607 HAMBURG

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)  
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)  
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE  
DIPL.-ING. ARNULF HUBER  
DR. ALLARD von KAMEKE  
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER  
DR. PETER FRANCK  
DR. GEORG BOTH  
DR. ULRICH-MARIA GROSS  
DR. HELMUT von HEESCH  
DR. JOHANNES AHME  
DR. HEINZ-PETER MUTH  
DIPL.-ING. LARS MANKE  
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU  
DR. BERND JANSSEN  
DR. ALBRECHT von MENGES

RECHTSANWALT  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEY  
DR. FRANK DETTMANN

April 2000  
P 53306 WE/Lsch/wo

Prof. Dr. Axel R. Zander  
Ahrenfelder Weg 41  
22926 Ahrensburg

Verwendung von CD34 oder einem davon abgeleiteten  
Polypeptid als Zell-Oberflächen- bzw. Gentransfer-Marker

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von CD34 oder einem davon abgeleiteten Polypeptid als Zell-Oberflächen- bzw. Gentransfer-Marker. Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung ein Gentransfervektor sowie mit dem Vektor transfizierte Wirtszellen, wobei der Vektor ein Transgen und eine für CD34, ein Fragment desselben oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält. Der Vektor eignet sich besonders zur Anwendung in Verfahren zur Identifizierung und/oder Selektion genetisch modifizierter Zellen und in der Gentherapie. Die Erfindung betrifft daher ferner Kits zur Durchführung dieser Verfahren und die Verwendung des Vektors *in vitro* und *in vivo*.

Markergene sind wichtige Hilfsmittel, um die Identifizierung und Selektion genetisch modifizierter Zellen in der experimentellen Immunologie, Hämatologie und Gentherapie zu ermöglichen. Der low affinity nerve growth factor receptor (vollständige Länge, LNGFR, oder intracytoplasmatisch trunkiert, ΔLNGFR), Varianten

humaner und muriner Oberflächenantigene wie CD24, CD2, CD4 $\zeta$  sowie das enhanced green fluorescent protein (EGFP) werden für diesen Zweck derzeit am häufigsten verwendet. Keiner dieser Marker scheint jedoch insbesondere für die klinische Praxis optimal zu sein. Ein für diesen Zweck geeigneter Marker sollte humanen Ursprungs sein, um eine Immun-Abstoßung zu vermeiden. Ferner sollte er nur auf den genetisch veränderten Zellen präsentiert werden, ohne in den Extrazellulärraum freigesetzt zu werden. Insbesondere sollten für die klinische Praxis einsetzbare Marker die physiologischen Funktionen der Targetzellen nicht stören. Die bislang verwendeten Oberflächenmarker sind insbesondere für den klinischen Einsatz, d.h. im Rahmen einer Gentherapie, nur bedingt geeignet (vergl. B. Fehse et al., Gene Therapy 5 (1998) 429-430).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Oberflächenmarker zur Identifizierung und Selektion genetisch modifizierter Zellen zur Verfügung zu stellen, die die im Zusammenhang mit den im Stand der Technik verwendeten Markern beobachteten Nachteile nicht aufweisen. Die Marker sollen insbesondere geeignet sein, im Rahmen eines gentherapeutischen Protokolls zur Selektion/Identifikation transduzierter Zellen des hämatopoetischen Systems, insbesondere primärer humaner oder muriner T-Lymphozyten, verwendet zu werden, ohne mit der Hämatopoese zu interferieren.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verwendung des CD34-Oberflächenantigens, eines Fragmentes desselben oder einer Variante derselben gelöst. Im besonderen wird die Aufgabe durch den Gegenstand der beigefügten Ansprüche gelöst.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise festgestellt, daß sich CD34 ausgezeichnet zur Identifizierung und/oder Selektion genetisch modifizierter Zellen eignet, wobei als Target-Zellen insbesondere auch primäre T-Lymphozyten verwendet werden können, die nach Transduktion mit einem Gentrans-

- fervektor im Rahmen eines gentherapeutischen Protokolls einem Empfängerorganismus verabreicht werden können, ohne daß es zu Störungen bei der Hämatopoese kommt. Obwohl hämatopoetische Stammzellen CD34 exprimieren, wird durch den von den genetisch
- 5 modifizierten Zellen exprimierten Oberflächenmarker die Hämatopoese unerwarteterweise nicht negativ beeinflusst. Insbesondere wurde überraschenderweise festgestellt, daß es durch die Expression von CD34 auf den Target-Zellen nicht zu einer negativen Beeinflussung der Zellfunktion bzw. Zelldifferenzierung kommt.
- 10 Es konnte ferner gezeigt werden, daß der exprimierte Oberflächenmarker für die Zielzellen nicht toxisch ist und er - da es sich um ein humanes Protein handelt - im Empfängerorganismus nicht immunogen wirkt.
- 15 Da CD34 natürlicherweise nur auf sehr wenigen Zelltypen, wie humanen Vorläufer- und Stammzellen, exprimiert wird, eignet sich CD34 in besonders vorteilhafter Weise zum Aufreinigen und zur Analyse von Zellen, die CD34 natürlicherweise nicht exprimieren, besonders aber zur Identifikation und/oder Selektion genetisch
- 20 modifizierter (transduzierter) Zellen, wofür im Stand der Technik insbesondere auch die für die klinische Praxis zugelassenen Technologien, einschließlich gut charakterisierter monoklonaler Antikörper, existieren, die eine Anreicherung der markierten Zellen in hoher Reinheit gemäß GMP-Bedingungen (good manufacturing practice) gestatten.
- 25

Zum Aufreinigen und zur Analyse bzw. zum Nachweis von Zellen, die CD34 natürlicherweise nicht exprimieren, wird eine für CD34 (oder für ein Fragment desselben oder eine Variante desselben)

30 kodierende Nukleinsäuresequenz mit Hilfe eines Vektors in diese Zellen in einer zur dortigen Expression geeigneten Form eingebracht.

Für die Markierung genetisch modifizierter Zellen wird erfindungsgemäß eine für CD34 (oder für ein Fragment desselben oder eine Variante derselben) kodierende Nukleinsäuresequenz gemein-

35

sam mit der für die eigentliche Transduktion verwendeten Gensequenz (Transgen) in die Zielzelle übertragen. Unter "Transgen" wird vorliegend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die für ein Protein, Polypeptid oder Peptid kodiert, das in der Target-Zelle (Zielzelle, Wirtszelle) exprimiert wird und dieser Zelle eine neue Eigenschaft oder Funktion verleiht. Das Transgen unterscheidet sich somit von anderen im Rahmen der Transduktion übertragenen Nukleinsäuresequenzen dadurch, daß das in der Wirtszelle gebildete Expressionsprodukt die physiologischen Eigenschaften bzw. die Funktionalität der Zelle unmittelbar beeinflusst. Im Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung handelt es sich bei dem Transgen um eine für ein therapeutisch wirksames Protein, Polypeptid oder Peptid kodierende Nukleinsäuresequenz.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein (Gen-transfer)-Vektor, der

(a) ein Transgen (optional) und

20 (b) eine für einen Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz enthält,

wobei der Oberflächenmarker das CD34-Oberflächenantigen oder ein Fragment desselben ist. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind Varianten dieser Sequenzen, die dieselben oder im wesentlichen die gleichen Eigenschaften und Vorteile wie das CD34-Oberflächenantigen aufweisen, wobei sämtliche durch Aminosäureaustausche, -deletionen und -insertionen denkbare Varianten eingeschlossen sind.

30

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist das CD34-Oberflächenantigen die in SEQ ID NO:2 angegebene Sequenz auf, wobei die für dieses Protein kodierende Nukleinsäuresequenz vorzugsweise die in SEQ ID NO:1 angegebene Sequenz ist. Durch die Degeneration des genetischen Codes sind erfindungsgemäß Varianten und Mutanten dieser Nukleinsäuresequenz eingeschlos-

35

sen, die für dasselbe Protein kodieren. Die Erfindung betrifft ferner Fragmente, Mutanten und Varianten der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenz, die für ein mit CD34 vergleichbares Protein, Polypeptid oder Peptid kodieren, das dieselben oder im wesentlichen die gleichen Eigenschaften aufweist und sich als Oberflächenmarker zur Identifikation und/oder Selektion genetisch modifizierter Zellen eignet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich gezeigt, daß Nukleinsäuresequenzen von Vorteil sind, die für eine verkürzte Form des CD34-Oberflächenantigens kodieren, d.h. für Varianten, bei denen die Proteinase C (PKC) Phosphorylierungssites deletiert sind. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind somit cytoplasmatisch ganz oder teilweise deletierte Varianten des CD34-Oberflächenantigens sowie Gentransfervektoren, die für diese Varianten kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorzugsweise ist diese Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID NO:3 oder 5 angegebene Sequenz.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung hat sich gezeigt, daß bei der Expression der trunkierten bzw. deletierten Varianten des CD34-Proteins gemäß SEQ ID NO:4 bzw. 6 in besonders geeigneter Weise genetisch transduzierte Zellen nachweisen und selektieren lassen. Da sich die beiden Polypeptide nur darin unterscheiden, daß die trunkierte Variante (tCD34) um 15 Aminosäuren länger ist als die deletierte Variante (dCD34), können selbstverständlich auch andere Varianten in Betracht kommen, deren Länge zwischen derjenigen der trunkierten und der deletierten Variante liegt. Dementsprechend wird die für den Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz eine Länge aufweisen, die zwischen den Längen der in SEQ ID NO:3 und 5 angegebenen Sequenzen liegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß die trunkierte Variante tCD34, gegenüber der deletierten Variante, dCD34, den Vorteil aufweist, daß das Oberflächenantigen stabiler in der Membran der transduzierten Zellen verankert ist, wodurch

die Identifikation und Selektion der genetisch modifizierten Zellen aufgrund der geringeren Freisetzung in den Extrazellulär-  
raum deutlich verbessert wird. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung weist die für den Oberflächenmarker  
5 kodierende Nukleinsäuresequenz insbesondere die in SEQ ID NO:3 angegebene Sequenz oder eine durch Mutation davon abgeleitete Sequenz auf. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kommen selbstverständlich auch andere für tCD34 gemäß SEQ ID  
10 NO:4 kodierende Nukleinsäuresequenzen in Betracht. Ferner eingeschlossen sind Nukleinsäuresequenzen, die für Varianten des trunkierten CD34-Oberflächenantigens (einschl. durch Aminosäureaustausche, -deletionen und -insertionen erhaltene Varianten) kodieren, die dieselben oder im wesentlichen die gleichen Eigenschaften wie das in SEQ ID NO:4 angegebene Polypeptid aufweisen.

15 Der erfindungsgemäße Vektor kann ein nicht-viraler, viraler oder retroviraler Vektor sein. Ein gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erhaltener retroviraler Vektor, der für tCD34 kodiert, wurde am 27.03.2000 bei der Deutschen Sammlung  
20 für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Nr. DSM 13396 hinterlegt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält der Gentransfervektor ferner eine für einen weiteren Oberflächenmarker, wie z.B. CD2, EGFP etc., oder insbesondere für ein  
30 therapeutisches Gen (wie z.B. Adenosindesaminase (ADA) zur Heilung des schweren Immundefizienzsyndroms ADA-SCID; oder andere) oder ein Suizidgen kodierende Nukleinsäuresequenz. Ein Suizidgen als Transgen ermöglicht eine spätere Elimination transduzierter Zellen.

Als Transgen wird erfindungsgemäß jede Nukleinsäuresequenz (Fremdgen) verstanden, die natürlicherweise nicht im Genom des  
35 Wirts- oder Empfängerorganismus oder im Vektorgenom enthalten



ist bzw. jede Nukleinsäuresequenz, die auf einen Empfänger bzw. Wirt (eine Empfänger- oder Wirtszelle) übertragen werden soll.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Wirtszelle, die mit einem vorgenannten Vektor transfiziert ist. Diese Wirtszelle zeichnet sich dadurch aus, daß sie neben dem Transgen auch die für den Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz enthält und der Marker auf der Oberfläche der Wirtszelle exprimiert wird. Die Wirtszelle kann eine humane oder nicht-  
10 humane (z.B. murine) Zelle sein, wobei (humane) T-Lymphozyten bevorzugt sind.

Die Erfindung schließt die Verwendung eines für das CD34-Oberflächenantigen oder ein Fragment derselben oder eine Mutante, Variante derselben (Marker) kodierenden Nukleinsäuresequenz (Marker-  
15 gen) zum Nachweis genetisch modifizierter Zellen ein, bei dem man die Nukleinsäuresequenz in einen für die genetische Modifikation verwendeten Gentransfervektor einbaut, der eine in die Zellen zu transferierende Nukleinsäuresequenz (Transgen) enthält, wobei man das Markergen und den Vektor so auswählt, daß der Marker auf der Oberfläche der mit dem Vektor transfizierten Zellen exprimiert wird, wobei man die genetisch modifizierten Zellen durch spezifischen Nachweis des Markers identifiziert. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis genetisch modifizierter Zellen, bei dem man die Zellen mit einem vorgenannten Vektor transfiziert und die trans-  
20 duzierten Zellen durch selektiven Nachweis des auf der Oberfläche der Zellen exprimierten Markers nachweist. Dieser Nachweis kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden durchgeführt werden, wie z.B. mittels durchflußzytometrischer Analyse (vgl. Fehse et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997) 1815-1824) oder immunhistochemischen Methoden (Ruggieri et al., Human Gene Ther. 8 (1997) 1611-1623) unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern.  
30

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Selektion genetisch modifizierter Zellen, bei dem man die Zellen mit einem vorgenannten Vektor transfiziert und man die transduzierten Zellen an ein für den Oberflächenmarker spezifisches Agens, insbesondere einen (monoklonalen) Antikörper, bindet und die Zellen somit von den genetisch nicht modifizierten Zellen trennt. (wie z.B. durch magnetic cell sorting, Fehse et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997) 1815-1824; oder andere Immunadhäsionstechniken oder Fluorescence-activated cell sorting, FACS, vgl. z.B. Phillips et al., Nat. Med. 2 (1996) 1154-1156).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Zellen vorzugsweise um humane Zellen, wobei humane T-Lymphozyten besonders bevorzugt sind.

15

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kit zur Durchführung des o.g. Nachweis-Verfahrens, das einen vorgenannten Vektor, Mittel zum spezifischen Nachweis des Oberflächenmarkers (einschließlich Mittel zur Durchführung einer Durchflußzytometrie oder Immunhistochemie), insbesondere monoklonale Antikörper, sowie weitere zur Durchführung des Nachweises erforderliche Agentien und Hilfsmittel, wie z.B. geeignete Puffer und Blockierungslösungen, enthält.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kit zur Durchführung des o.g. Selektions-Verfahrens, das einen vorgenannten Vektor, Mittel zur spezifischen Bindung des Oberflächenmarkers, wie z.B. an magnetic bzw. paramagnetic beads gekoppelte Antikörper, sowie weitere zur Durchführung der Selektion erforderliche Agentien und Hilfsmittel enthält.

30

Wie bereits oben erwähnt, zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor besonders aufgrund seiner Eignung für gentherapeutische Anwendungen aus. Die Erfindung betrifft daher ferner die Verwendung eines vorgenannten Vektors zur Herstellung eines gentherapeutischen Arzneimittels, insbesondere zur Transduktion von

35

(humanen) T-Lymphozyten, sowie ein diesen Vektor enthaltendes gentherapeutisches Arzneimittel. Ferner eingeschlossen ist die Verwendung von (humanen) T-Lymphozyten, die mit einem vorgenannten Vektor transfiziert sind, zur gentherapeutischen Behandlung.

- 5 Die Erfindung betrifft schließlich ein gentherapeutisches Arzneimittel, das (humane) T-Lymphozyten enthält, die mit dem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert sind.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von  
10 Beispielen, Figuren und einem Sequenzprotokoll näher beschrieben.

### Beispiele

15

In den folgenden Beispielen wurden die folgenden allgemeinen Techniken verwendet:

- a) Kultivierung von primären Zellen und Zell-Linien.

20

Mononukleäre Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender durch Zentrifugation auf einem Ficoll-Gradienten (Biochrom, Berlin, Deutschland) isoliert (900 g, 20 Min.). T-Zellen wurden mit 10 ng/ml OKT-3 (Cilag, Neuss, Deutschland) stimuliert und bei einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml in Gegenwart von 100 U/ml IL-2 (Roche, Mannheim, Deutschland) in X-vivo 10 (BioWhittaker, Verviers, Belgien) kultiviert, das 8% autologes Serum enthielt (F.A. Ayuk et al., Gene Ther. 6 (1999) 1788-1792). Jurkat und K562-Zellen wurden in RPMI 1640 gehalten, das 10% fötales Kälberserum (FCS) und 2 mM Glutamin enthielt (alles von Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland). Die Produzentenzellen retroviraler Vektoren Phoenix amphi (<http://www.stanford.edu/group/holan/NL-phnrxr.html>, Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A. et al., Cancer Res. 58 (1998) 14-19) und PG13 (ATCC CRL-10686, <http://www.ATCC.org> - vgl. A.D. Miller et al., J. Virol. 65 (1991) 2220-

25

30

35

2224) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium gehalten (DMEM + Glutamax; Gibco BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und Natriumpyruvat (finale Konzentration 1mM, Gibco BRL) ergänzt worden war. Alle Zellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre in CO<sub>2</sub> Inkubatoren gehalten (Heraeus, Hannover, Deutschland).

b) Gentransfer in K562, Jurkat und primäre humane T-Zellen.

Primäre T-Zellen wurden mit OKT-3 (s.o.) stimuliert und 3 Tage lang in Gegenwart von 100 U/ml IL-2 kultiviert. Jurkat und K562-Zellen wurden ohne vorhergehende Stimulierung transduziert.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 3 ml filtriertem, Retroviren-enthaltendem Überstand suspendiert, und 4 µg/ml Protaminsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden hinzugegeben. Die Zellen wurden eine Stunde lang bei 2000 U/min. in 6-Well-TC Platten (Becton Dickinson) zentrifugiert. Die Transduktionen wurden nach 24 Stunden wiederholt. Die Zellen wurden mindestens 2 Tage lang vor der Bestimmung der Gentransfer-Effizienz in Kultur gehalten.

c) Southern, Northern und Western blot

Southern, Northern und Western blots wurden entsprechend Standardprotokollen durchgeführt (F.M. Ausubel et al., Short protocols in molecular biology, 2. Auflage, John Wiley and Sons, New York, 1992). Southern und Northern blots wurden mit radioaktiv (<sup>32</sup>P) markiertem flCD34 hybridisiert. Bei Western blots und Immunopräzipitationen wurden Zell-Lysate oder Zellkultur-Überstände wie unten angegeben verwendet.

*Beispiel 1:*

Klonierung, Herstellung und genetische Charakterisierung von flCD34-, tCD34- und dCD34-exprimierenden retroviralen Vektoren

- 5 Die drei Arten von CD34, die in dieser Studie analysiert wurden, sind in Figur 1a dargestellt. Die cDNAs für flCD23, tCD34 und dCD34 wurden mittels einer RT-PCR mit RNA erhalten, die aus humanen TF1 Leukämie-Zellen gewonnen wurde, die CD34 endogen exprimieren (Figur 2b und Daten aus Durchfluß-Zytometrie, nicht  
10 gezeigt). Dabei wurde die RNA aus humanen CD34<sup>+</sup>-Leukämie-Zellen (TF1) unter Verwendung des RNeasy Mini Kits isoliert (Qiagen, Hilden, Deutschland). cDNA wurde unter Verwendung eines oligo-dT Primers und Superscript<sup>TM</sup> Reverser Transkriptase (Gibco BRL) entsprechend den Anweisungen des Herstellers synthetisiert. Der  
15 offene Leserahmen für flCD34 wurde mittels PCR unter Verwendung von Pfu Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und den Primern CD34fw 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCATGCCGCGGGGCTGGAC-3' (SEQ ID NO: 7) und CD34rev 5'-TAAGCTTATCACAATTCGGTATCAGCCACCA-3' (SEQ ID NO: 8) erhalten. Die flCD34 cDNA diente als Matritze für die  
20 Herstellung von tCD34 und dCD34 unter Verwendung der Primer CD34fw + CD34lrev (5'-CAATAAGCTTATCATGGTTCTAGTTCCAGCC-TTCTCCTGTGGGGCT-3'; SEQ ID NO: 9) bzw. CD34fw + CD34srev (5'-CAATAAGCTTATCAATTCATCAGGAAATAGCCAG-3'; SEQ ID NO: 10).
- 25 Die Sequenzierung der subklonierten PCR-Produkte ergab einen A-G Austausch (durch Vergleich mit den Sequenzen M81104 und S53811 in GenBank; vgl. D.L. Simmons et al., J. Immunol. 148 (1992) 267-271), was zu einem Austausch von Glutamat für Lysin in Kodon 349 von flCD34 führt. Dieses Kodon liegt im zytoplasmatischen  
30 Abschnitt des Proteins und ist in tCD34 und dCD34 nicht vorhanden, daher wurde es für diese Studie nicht verändert. Alle Varianten weisen das kürzere Signalpeptid auf, das in GenBank M81104 beschrieben ist (vgl. D.L. Simmons et al., J. Immunol. 148 (1992) 267-271). Die cDNAs wurden in die Polylinker-Region  
35 von pKS und vom retroviralen Expressionsvektor pSFall unter Verwendung von NotI und HindIII Restriktionsschnittstellen klo-

niert. Die retroviralen Vektoren (Fig. 1A) verwenden den Enhancer/Promoter einer Variante des murinen spleen focus-forming virus (SFFVp) zur Initiation der Transkription, der moderate Aktivität in murinen und humanen T-Zellen zeigt (C. Baum et al., Virol. 88 (1995) 7541-7547; eigene Resultate). Ferner enthalten sie eine untranslatierte gag-Ersatz-Leader-Region (gag-replacement (GR) leader region), die größtenteils die Expression von aberranten Proteinen oder Peptiden unterbindet (M. Hildinger et al., J. Virol. 73 (1999) 4083-4089). Retrovirale Vektoren mit hohen infektiösen Titern wurden nach Transduktion der resultierenden Plasmide in Phoenix-ampho Verpackungszellen erhalten. Dabei wurden Phoenix-Zellen (amphotropes Env-Protein) unter Verwendung des Kalziumphosphat-Transduktions-Kits (PeqLab, Erlangen, Deutschland) transfiziert. In einigen Experimenten wurde ein Plasmid-Expressions-Vektor co-transfiziert, der für das Glycoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) kodiert, um gemischte amphotrope/VSV-g Pseudotypen zu erhalten. Dies führte zu gemischten Pseudotypen mit Titern, die größer als  $10^6$ /ml waren, was die Infektion verschiedener humaner und muriner Zelltypen gestattete. Um stabile retrovirale Produzentenzellen zu erhalten und um die Integrität und Leistungsfähigkeit der retroviralen Konstrukte zu testen, wurden retrovirale Verpackungszellen PG13 und humane K562 Erythroleukämiezellen mit den Überständen der transduzierten Phoenixzellen transduziert. Durch anschließende Sortierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen und Verwendung von MACS Technologie (Magnetic cell sorting; Verfahren zur Anreicherung von microbeads-Antikörper-markierten Zellen mit Hilfe spezieller MACS-Säulen, die in ein starkes Magnetfeld gebracht werden) konnten PG13-Zellen (Gibbon-Affe Leukämie Virus Env-Proteine) Massenproduzentenkulturen hergestellt werden. PG13 Klone wurden nach limitierender Verdünnung isoliert. Southern blot-Analyse transduzierter polyklonaler PG13 und K562-Zellen zeigte die genetische Stabilität der Konstrukte (Figur 1b), wodurch sichergestellt wurde, daß die folgenden Analysen mit Zellen durchgeführt wurden, bei denen die Transgene korrekt prozessiert wurden. Überstände der Zellen wurden nach sechsstün-

diger Inkubation bei 37°C in X-vivo 10 gesammelt (F.A. Ayuk et al., Gene Ther. 6 (1999) 1788-1792). Virale Titer wurden durch Transduktion von Jurkat-Zellen mit seriellen Verdünnungen von Virus-enthaltenden Überständen und anschließender FACS-Analyse (B. Fehse et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997) 1815-1824) bestimmt.

*Beispiel 2:*

Anreicherung genetisch modifizierter Zellen durch CD34.

10

Die Durchfluß-Zytometrie ergab, daß in murinen Fibroblasten-PG13-Zellen und in humanen K562 hämatopoetischen Zellen die retroviralen Vektoren alle drei CD34-Varianten (flCD34, tCD34 und dCD34) in jeweils großen Mengen exprimierten. Die Unterschiede in den Transfer-Effizienzen entsprechen den Titern der Verpackungszellen. Polyklonale Populationen von PG13 und von K562-Zellen, die die drei verschiedenen Versionen von CD34 exprimierten, konnten leicht bis zu einer hohen Reinheit unter Verwendung eines auf Immunoaffinität basierenden Zellsortierens angereicht werden (MACS-Technologie) (Figur 2A, B). Dabei wurden die Zellen drei Tage nach der Transduktion unter Verwendung des CD34-Vorläufer-Zell-Isolations-Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers angereichert (B. Fehse et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997) 1815-1824). Nach der Anreicherung wurden die Zellen mit Phycoerythrin-gekoppeltem anti-CD34 (HPCA-2) markiert, wobei dieser Antikörper mit den für die Anreicherung verwendeten Antikörpern nicht interferiert. Der neue Phänotyp blieb sowohl für K562 (Fig. 2B) als auch für PG13 (Daten nicht gezeigt) mehrere Monate in Kultur stabil. Es konnte kein Einfluß der Varianten auf die Zellproliferation der transduzierten Zellen festgestellt werden. Durchfluß-Zytometrie ergab allerdings, daß die Zelloberflächenexpression von dCD34 schwächer als diejenige der anderen zwei Varianten war.

*Beispiel 3:*

Der residuale zytoplasmatische Teil des tCD34 ist an der Membranverankerung der Zelloberflächenmoleküle beteiligt.

5 Um die Mechanismen zu untersuchen, die den beobachtenden Expressionsunterschieden zugrundeliegen, wurden die drei transduzierten Varianten von CD34 auf der Ebene des Transkripts und des Proteins untersucht. Dies geschah unter Verwendung polyklonaler Populationen von K562 und PG13-Zellen, die mit den drei Versio-  
10 nen der retroviralen CD34-Vektoren transduziert worden waren und die für die Expression von CD34 immunselektiert worden waren. Das Histogramm der Zelloberflächenmarkierung mit CD34, mit dem die verschiedenen Varianten verglichen wurden, dokumentierte, daß die Expression von dCD34 um eine Größenordnung niedriger war  
15 als die von tCD34, das auf der Zelloberfläche genauso stark vertreten war wie flCD34 (Figur 3A). Vergleichbare Daten konnten mit humanen Jurkat-Lymphozyten erzielt werden (nicht gezeigt). Northern blot-Analyse (Figur 3B) bestätigte, daß die drei Varianten verschiedene Transkriptlängen aufwiesen und gleiche  
20 Gesamtexpressionsraten aufwiesen. Das stärkere Signal von flCD34 in K562-Zellen könnte durch eine höhere Beladung mit RNA erklärt werden, die sich aus einer Methylenblau-Färbung der Membran vor der Hybridisierung ergab (nicht gezeigt). Dieses Resultat zeigt, daß das 3'-Ende der CD34 cDNA keine Sequenzen enthält, die das  
25 Prozessieren der RNA beeinflussen. Der Expressionsverlust muß daher aus Unterschieden in der Prozessierung des CD34-Proteins stammen (Figur 3C, D).

Western blot-Analysen der Zell-Lysate bestätigten die durch die  
30 Durchfluß-Zytometrie erhaltenen Resultate. Figur 3C dokumentiert die, im Vergleich zu den zwei natürlich vorkommenden Formen tCD34 und flCD34, schwächere Expression von dCD34. Dies spricht gegen die unwahrscheinliche Möglichkeit, daß dCD34 im Zytoplasma zurückgehalten wird. Der Western blot ergab auch, daß dCD34, wie  
35 tCD34, verglichen mit flCD34, ein reduziertes Molekulargewicht aufweist.



Zusammengefaßt ergeben diese Resultate, daß die Membranverankerung von dCD34, dem der zytoplasmatische Teil fehlt, das aber noch die vollständige Transmembran-Domäne enthält, instabil sein kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurden nicht-konzentrierte Zellkultur-Überstände von K562-Zellen, die entweder mit dCD34 oder tCD34 transduziert worden waren (Figur 3D) immunpräzipitiert. Tatsächlich wurde CD34 in klar erhöhten Mengen in den Überständen der dCD34 exprimierenden Zellen nachgewiesen. Daher kann die reduzierte Zelloberflächenexpression von dCD34 durch eine Freisetzung aus der Membran erklärt werden. Es kann daraus geschlossen werden, daß der residuale zytoplasmatische Teil des tCD34 eine wichtige Funktion bei der Membranverankerung hat und dadurch das Ablösen des Zelloberflächenproteins verhindert.

#### *Beispiel 4:*

##### Expression von tCD34 in humanen T-Lymphozyten

Aufgrund der vorliegenden Resultate wurde tCD34 als interessanteste Variante für das Markieren von Zelloberflächen und die Immunselektion von genetisch veränderten Zellen ausgewählt. Eine wesentliche Anwendung dieser Technologie ist die Anreicherung von genetisch veränderten Lymphozyten zur Verwendung bei adoptivem Transfer in Patienten (C. Bonini et al., Science, 276 (1997) 1719-1724; P. Tiberghien et al., Hum. Gene Ther. 8 (1997) 615-624). Daher wurde untersucht, ob die retrovirale, vektorvermittelte Expression von tCD34 in humanen T-Zellen durchführbar ist.

Die Transduktion von humanen T-Zellen wird am besten unter Verwendung von retroviralen Vektoren durchgeführt, die mit dem Env-Protein des Gibbon-Affen-Leukämie-Virus (GALV) pseudotypisiert sind (GALV). Diese Vektoren können in PG13-Zellen hergestellt werden (F.A. Ayuk et al., Gene Ther. 6 (1999) 1788-1792; B.A. Bunnell et al., Blood 89 (1997) 1987-1995). Stabile Klone von PG13-Zellen, die den retroviralen Vektor SF $\alpha$ 11tCD34 in hohen

Titern exprimieren, wurden durch limitierte Verdünnung der entsprechenden Massenkultur erhalten. Eine Probe dieses Vektors wurde am 27.03.2000 bei der DSMZ in Braunschweig (s.o.) unter der Nr. DSM 13396 hinterlegt. Überstände dieser Produzentenzellen wurden für den Gentransfer in humane Jurkat T-Lymphoblastomzellen (Figur 4A) und in primäre periphere Blutlymphozyten (PBLs) verwendet, die mit IL-2 und OKT-3 stimuliert worden waren (Figur 4B). Wie mittels Durchfluß-Zytometrie bestimmt wurde, war die Expression von tCD34 in Jurkat-Zellen geringfügig höher als in primären T-Zellen. Ein ähnlicher Unterschied wurde auch mit einem retroviralen Vektor beobachtet, der identische Transkriptions-Kontrollelemente enthält, aber EGFP anstelle von tCD34 exprimiert (nicht gezeigt). Die Expression von tCD34 war stark genug, um eine Abtrennung dieser Zellen unter Verwendung der MACS-Technologie sowohl bei Jurkat und PBLs zu ermöglichen. Drei unabhängige Experimente wurden mit PBLs durchgeführt. Die immunselektierten Zellen wurden stets mit hoher Reinheit erhalten (Figur 4). Diese Zellen wurden bis zu einer Woche in Kultur beobachtet. Sie blieben CD34-positiv und zeigten keine offensichtlichen Änderungen in Proliferation oder Morphologie.

*Beispiel 5:*

Die Verwendung von tCD34 zum Verfolgen von genetisch veränderten murinen erythroiden, myeloiden und lymphoiden Zellen in vivo.

Schließlich wurde untersucht, ob tCD34 verwendet werden kann, um retroviral veränderte murine hämatopoetische Zellen, einschließlich primärer T-Zellen, in vivo zu markieren, die nach Transplantation mit multipotenten Vorläufer-Zellen erhalten werden. Nicht-fraktionierte mononukleäre Knochenmarkszellen wurden mit retroviralen Vektoren, die tCD34 oder als Kontrolle EGFP exprimierten, transduziert. Diese Vektoren waren im Hinblick auf die cis-agierenden Elemente identisch, die die Gen-Expression kontrollieren (Figur 1). Im einzelnen wurden die Zellen wie folgt gewonnen: Knochenmarkszellen wurden aus der Fibia und den

Femuren männlicher C57Bl/6J Spendermäuse (Alter 12-16 Wochen) 4 Tage nach intraperitonealer Verabreichung von 5-Fluorouracil (Sigma) (150 mg/kg) gewonnen. Mononukleäre Zellen wurden in IMDM-Medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) prästimuliert, das mit 20 % fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und einem üblichen Wachstumsfaktorcocktail supplementiert worden war, der murines IL-3 (10 ng/ml), humanes IL-6 (200 U/ml) und murines SCF (50 ng/ml) enthielt. Rekombinante Wachstumsfaktoren wurden von Strathmann Biotech erhalten (Hannover, Deutschland). Nach zwei Tagen Prästimulation wurden zellfreie Überstände von gemischten amphi/VSV-pseudotypisierten retroviralen Partikeln hinzugegeben. Die Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI), betrug 0,7 infektiöse Partikel pro Zelle, berechnet aus vorheriger Titration von Aliquots von Überständen auf SC-1 Fibroblasten. Polybren (Sigma) (4 µg/ml) wurde hinzugegeben, und die Zellen wurden eine Stunde lang bei 2000 U/min. zentrifugiert. Dieses Verfahren wurde dreimal innerhalb von 48 Stunden wiederholt, mit einer Pause von mindestens 8 Stunden zwischen den einzelnen Transduktionsschritten. Vergleichbare Transduktionsraten wurden dadurch erhalten, daß zellfreie Überstände mit äquivalenten Titern verwendet wurden. Einen Tag nach der abschließenden Transduktion wurden die Zellen in die Schwanzvenen von lethal bestrahlten (10 Gy), weiblichen Empfängern (n=6 für jeden Vektor) bei einer Dosis von  $2,2 \times 10^6$  Zellen pro Maus transplantiert. Neun Wochen nach der Transplantation wurden die peripheren Blutzellen mittels Durchfluß-Zytometrie bezüglich der Expression des Transgens in erythroiden Zellen (bestimmt durch Scatter-Eigenschaften), und in myeloiden Zellen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (identifiziert unter Verwendung der monoklonalen Antikörper CD11b, B220, und einer Kombination von CD4 und CD8) analysiert. Zellen dieser Linien, einschließlich T-Lymphozyten, exprimierten tCD34 in leicht detektierbaren Mengen (Figur 5A), woraus geschlossen werden kann, daß die transgenen und oberflächenmarkierten Zellen in vivo intakt differenzieren und im Wirts-Organismus verbleiben. Während EGFP und tCD34 in einer

vergleichbaren Frequenz in myeloiden und erythroiden Zellen gefunden werden konnten, war eine Tendenz dahingehend zu beobachten, daß lymphoide Zellen mit tCD34 etwas geringfügiger markiert wurden (Figur 5B).

5

### Figurenlegenden

#### *Figur 1*

10 Retrovirale Vektoren für die Expression aller drei Varianten von CD34.

(A) (oben) Schematische Darstellung der drei CD34-Varianten, (modifiziert aus D.S. Krause et al., Blood 87 (1996) 1-13): Die zytoplasmatischen Teile von flCD34, tCD34 und dCD34 umfassen 73, 16 und 1 Aminosäuren; (unten) provirale Form der retrovirenen Vektoren, die für die Expression von CD34 verwendet wurden. Die Größe der proviralen Form ist ca. 2,6 kb. Die lange terminale Wiederholung (long terminal repeat, LTR) stammt von einer Variante des murinen spleen focus forming virus. Die untranslatierte Leader Region enthält das retrovirale Verpackungssignal (Ψ) ohne gag-Sequenzen. Die cDNAs wurden unter Verwendung von NotI und HindIII-Restriktionsschnittstellen eingefügt.

25 (B) Southern blot-Analyse der immunselektierten K562- und PG13-Zellen, die mit den drei verschiedenen retroviralen CD34 Expressionsvektoren transduziert worden waren. Genomische DNAs wurden mit PstI verdaut. Die Hybridisierung mit der Sonde des humanen flCD34 ergab, wie angegeben, korrekte Insertlängen. Hybridisierungssignale mit höherem Molekulargewicht stammen von zellulären Genen. M, DNA Längenstandard-Mischung (Ladder mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

30

*Figur 2*

Auf stabiler Expression von retroviral transduziertem CD34 basierende Anreicherung von PG13- und K562-Zellen.

- 5 (A) PG13-Zellen nach Transduktion mit Phoenix-Überständen vor (PG13 pre, analysiert zwei Tage nach Transduktion) und sofort nach (PG13 post) Anreicherung unter Verwendung von Immunoaffinitäts-Säulen.
- 10 (B) K562-Zellen vor (K562 pre, analysiert zwei Tage nach Transduktion) und zwei Monate nach (K562 2mo post) Anreicherung unter Verwendung von Immunoaffinitäts-Säulen.

*Figur 3*

- 15 Die Zelloberflächenexpression von dCD34 ist aufgrund einer Abgabe in den zellulären Überstand reduziert.

(A) Histogramm der CD34-Expression in nicht-klonierten, mit dCD34 (d), tCD34 (t) oder flCD34 (fl) transduzierten K562-Zellen; Bestimmung mittels Durchfluß-Zytometrie zwei Monate nach der auf Immunoaffinität basierenden Anreicherung; es ergab sich eine Reinheit von 96%, 98% bzw. 97%; Zelloberflächenexpression von dCD34 ist im Vergleich mit tCD34 und flCD34 etwa um eine Größenordnung reduziert. Ähnliche Resultate wurden mit Jurkat-Zellen erhalten (nicht gezeigt).

(B) Northern blot-Analyse von Gesamt-RNA, geerntet aus Massenkulturen von K562 und PG13-Zellen, die mit den drei Varianten des CD34-Expressionsvektors transduziert worden waren, oder von nicht-transduzierten Zellen (-). TF1-Zellen sind als positive Kontrolle gezeigt, mit einer endogenen Expression von flCD34 (untere Bande, ungefähr 2,3 kb) und tCD34 (obere Bande, ungefähr 2,5 kb) (Krause et al., a.a.O., 1996). Ein Vergleich mit der Beladungskontrolle (mit Methylenblau angefärbter Filter, nicht gezeigt) bestätigte die vergleichbaren Expressionsmengen aller drei retroviralen RNAs in transduzierten Zellen.

(C) Western blot-Analyse von Zell-Lysaten, geerntet aus transduzierten und nicht-transduzierten PG13 und K562-Zellen (dieselben Kulturen wie in (A) und (B)). Eine schwächere Expression von dCD34 wird bestätigt. Es ist festzuhalten, daß dCD34 und tCD34 ein geringeres Molekulargewicht (etwa 100 kDa), verglichen mit flCD34 (ungefähr 110 kDa), aufweisen. 20 µg Protein wurden pro Spur geladen, CD34 wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers QBEND 10, HRP-konjugiertem Ziege-Anti-Maus IgG und dem SuperSignal<sup>TM</sup> West Pico Chemoluminiszenzsubstrat (Pierce, Rockford, Illinois) bestimmt.

(D) Immunpräzipitation mit HPCA-2 Antikörper aus zellulären Überständen von K562-Zellen, die mit tCD34 (t) oder dCD34 (d) transduziert worden waren oder von nicht-transduzierten Zellen (-). Der Pfeil zeigt lösliches CD34 an. Zell-Lysate von K562:flCD34-Zellen sind als positive Kontrolle (co) gezeigt, genauso wie immunpräzipitierte Lysate von K562:flCD34-Zellen. Die Selektion wurde mittels Western blot, wie oben beschrieben, durchgeführt.

20

#### *Figur 4*

Anreicherung von genetisch veränderten humanen T-Zellen, einschließlich primärer peripherer Blutlymphozyten (PBL) unter Verwendung von retroviralen Vektoren, die tCD34 exprimieren. Die Isotypen-Kontrolle ist als Insert (iso) in der Dot blot Analyse gezeigt, die vor dem (pre) magnetischen Zellsortieren (MACS-Technologie) erhalten wurde. In unabhängigen Experimenten war die Reinheit nach der Anreicherung (post) 95,5%, 96,9% und 97,3% für PBL nach einem anfänglichen positiven Signal von 6,7%, 23,9% und 23,4%.

30

#### *Figur 5*

Expression von tCD34 auf murinen peripheren Blutzellen in vivo.

(A) Repräsentative Dot blots, die die Expression von tCD34 im Blut lebender Mäuse zeigen, Status 9 Wochen nach Knochenmarks-

35

transplantation mit retroviral markierten Zellen. Periphere Blutzellen von C57Bl/6J Mäusen wurden durch Ausbluten der Schwanzvene erhalten und wurden mittels Durchfluß-Zytometrie auf die Expression von tCD34 getestet. Mittels Scatter-Profil und abstammungsspezifischen Antikörpern wurden myeloide Zellen (CD11b), B-Zellen (B220), T-Zellen (Cocktail von CD4 und CD8) und Erythrozyten unterschieden, wobei letztere der Größe nach entsprechend dem Forward Scatter (FSC) bestimmt wurden. Die Marker wurden basierend auf Isotypen-Kontrollen angepaßt.

(B) Die Markierungseffizienz mit tCD34 ist vergleichbar mit Resultaten, die mit EGFP erhalten wurden. Die Multiplizität der Infektion wurde auf eine gleiche Gentransfereffizienz angepaßt, wie durch gleiche Markierung in myeloiden und erythroiden Zellen aufgezeigt. Es ist festzuhalten, daß eine Tendenz dahingehend besteht, daß Lymphozyten mit tCD34 etwas geringer markiert werden als solche mit EGFP. Gezeigt sind die Mittelwerte (Prozentsatz von Marker-positiven Zellen) sowie die Standardabweichungen. Sechs Tiere waren in einer Experimentengruppe.

#### *Figur 6*

Plasmid basierend auf pUC (Ampicillin-Resistenz, ColE1 ori). Die cDNA von zytoplasmatisch trunkierter Variante von humanem CD34 (tCD34) befindet sich zwischen NotI (5'-Ende) und HindIII (3'-Ende)

In dem Plasmid pSFalpha11tCD34 befindet sich der Leserahmen von tCD34, einer Spleißvariante des humanen CD34-Differenzierungsantigens, zwischen NotI und HindIII. Er liegt damit funktionell unter Kontrolle eines eukaryontischen Promotors mit anschließender 5'-untranslatierter Region (Region 150 bp stromaufwärts von XbaI bis NotI, umfasst Sequenzen der Mausretroviren MPSV und MESV). Zur Polyadenylierung gibt das entsprechende Signal im Long Terminal Repeat (LTR) des SFFV-Retrovirus Anlass; dieses LTR befindet sich zwischen HindIII und XhoI. Die transkriptionsregulierenden Signale werden nur bei Transfektion in eukaryon-

tische Zellen erkannt. Die Sequenzen stromabwärts von XhoI bis ca. 150 bp stromaufwärts von XbaI umfassen das auf pUC19 basierende Plasmidrückgrat, das in transformierten Bakterien Ampicillin-Resistenz vermittelt und den Replikationsursprung für das  
5 Plasmid trägt.



Patentansprüche:

1. Gentransfervektor, der

a) ein Transgen und

b) eine für einen Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz enthält,

dadurch gekennzeichnet, daß der Oberflächenmarker das CD34-Oberflächenantigen oder ein Fragment desselben oder eine Variante desselben ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz für einen Oberflächenmarker gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 oder für ein Fragment oder eine Variante derselben kodiert.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 angegebene Sequenz oder ein Fragment, eine Mutante oder Variante derselben ist.

4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er ein retroviraler Vektor ist.

5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er eine für einen weiteren Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz enthält.

6. Vektor mit der Hinterlegungsnummer DSM 13396.

7. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine für die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6, ein Fragment oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält.

8. Vektor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5, ein Fragment, eine Mutante oder Variante derselben enthält.
9. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 8 transfiziert ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine humane Zelle ist.
11. Wirtszelle nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein T-Lymphozyt ist.
12. Verfahren zum Nachweis genetisch modifizierter Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5 transfiziert und die transduzierten Zellen durch Nachweis des Oberflächenmarkers identifiziert.
13. Verfahren zur Selektion genetisch modifizierter Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5 transfiziert, man die transduzierten Zellen an ein für den Oberflächenmarker spezifisches Agens bindet und sie von den genetisch nicht modifizierten Zellen trennt.
14. Verfahren zum Nachweis und zur Analyse von Zellen, die dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem Vektor transduziert, der eine für den Oberflächenmarker CD34, ein Fragment desselben oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, und man die transduzierten Zellen durch Nachweis des Oberflächenmarkers identifiziert, wobei die Zellen CD34, ein Fragment oder eine Variante desselben nicht natürlicherweise exprimieren.

15. Verfahren zum Aufreinigen von Zellen, die CD34, ein Fragment oder eine Variante desselben nicht natürlicherweise exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem Vektor transfiziert, der eine für den Oberflächenmarker CD34, ein Fragment desselben oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, und man die transduzierten Zellen an ein für den Oberflächenmarker spezifisches Agens bindet und sie von den Zellen trennt, die den Oberflächenmarker nicht exprimieren.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz für einen Oberflächenmarker gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 oder für ein Fragment oder eine Variante derselben kodiert.
17. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Oberflächenmarker kodierende Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 angegebene Sequenz oder ein Fragment, eine Mutante oder Variante derselben ist.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein retroviraler Vektor ist.
19. Verfahren nach den Ansprüchen 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man den Vektor entsprechend DSM 13396 verwendet.
20. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen humane Zellen sind.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen T-Lymphozyten sind.
22. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5, Mittel zum spezifischen Nachweis des Oberflä-

chenmarkers sowie weitere zur Durchführung des Nachweises erforderliche Agenzien und Hilfsmittel enthält.

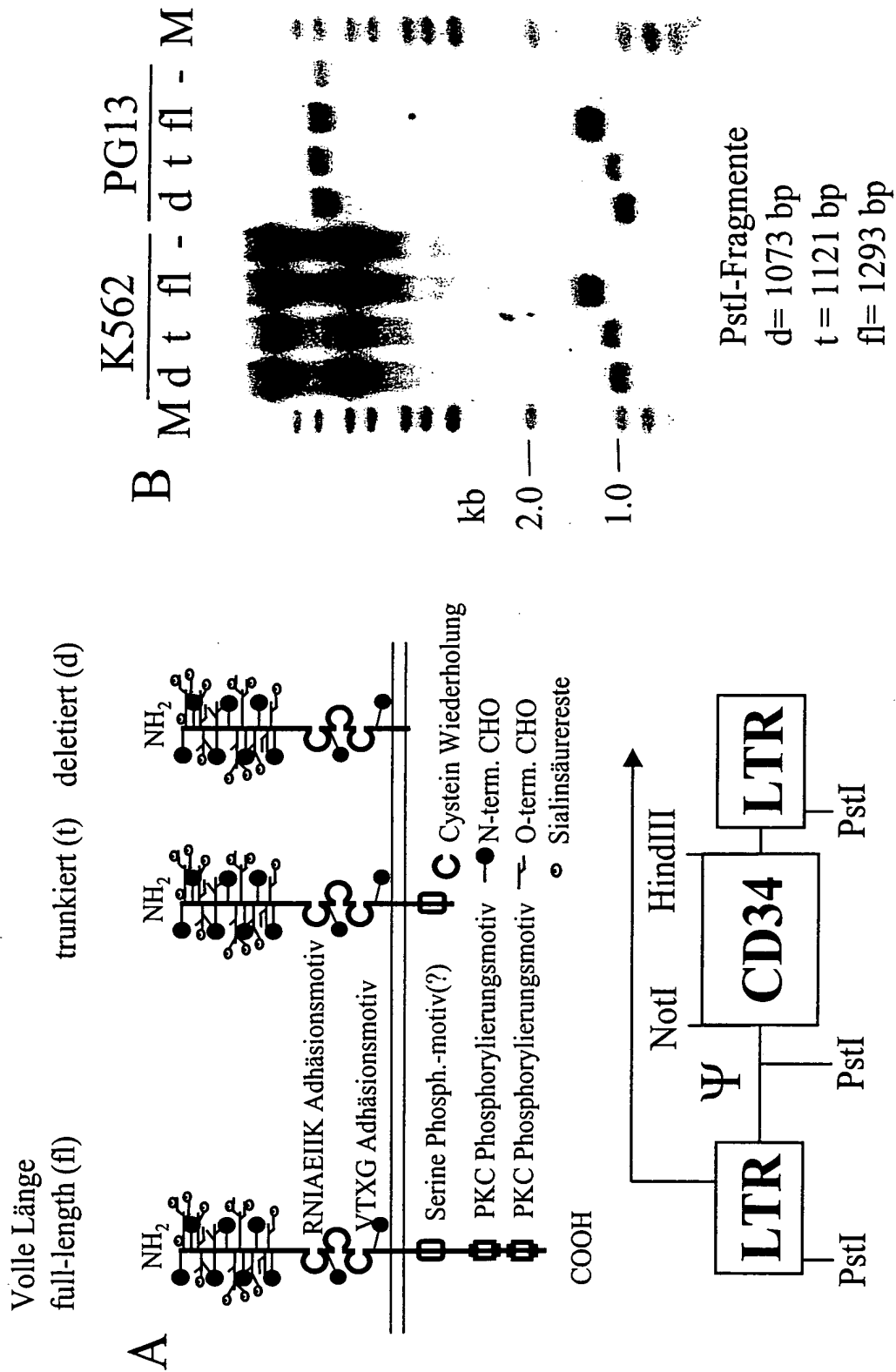
23. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es einen wie in den Ansprüchen 14 bis 19 genannten Vektor, Mittel zum spezifischen Nachweis des Oberflächenmarkers sowie weitere zur Durchführung des Nachweises erforderliche Agenzien und Hilfsmittel enthält.
24. Kit zur Durchführung eines Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5, Mittel zur spezifischen Bindung des Oberflächenmarkers sowie weitere zur Durchführung der Selektion erforderliche Agenzien und Hilfsmittel enthält.
25. Kit zur Durchführung eines Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es einen wie in den Ansprüchen 14 bis 19 genannten Vektor, Mittel zur spezifischen Bindung des Oberflächenmarkers sowie weitere zur Durchführung der Selektion erforderliche Agenzien und Hilfsmittel enthält.
26. Verwendung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur *in vitro* Transduktion von T-Lymphozyten.
27. Verwendung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur gentherapeutischen Behandlung.
28. Verwendung von T-Lymphozyten, die mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5 transduziert sind, zur gentherapeutischen Behandlung.
29. Verwendung eines Vektors, der eine für den Oberflächenmarker CD34, ein Fragment desselben oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, zum Aufreinigen, zum Nachweis und zur Analyse von Zellen *in vitro*, die CD34, ein

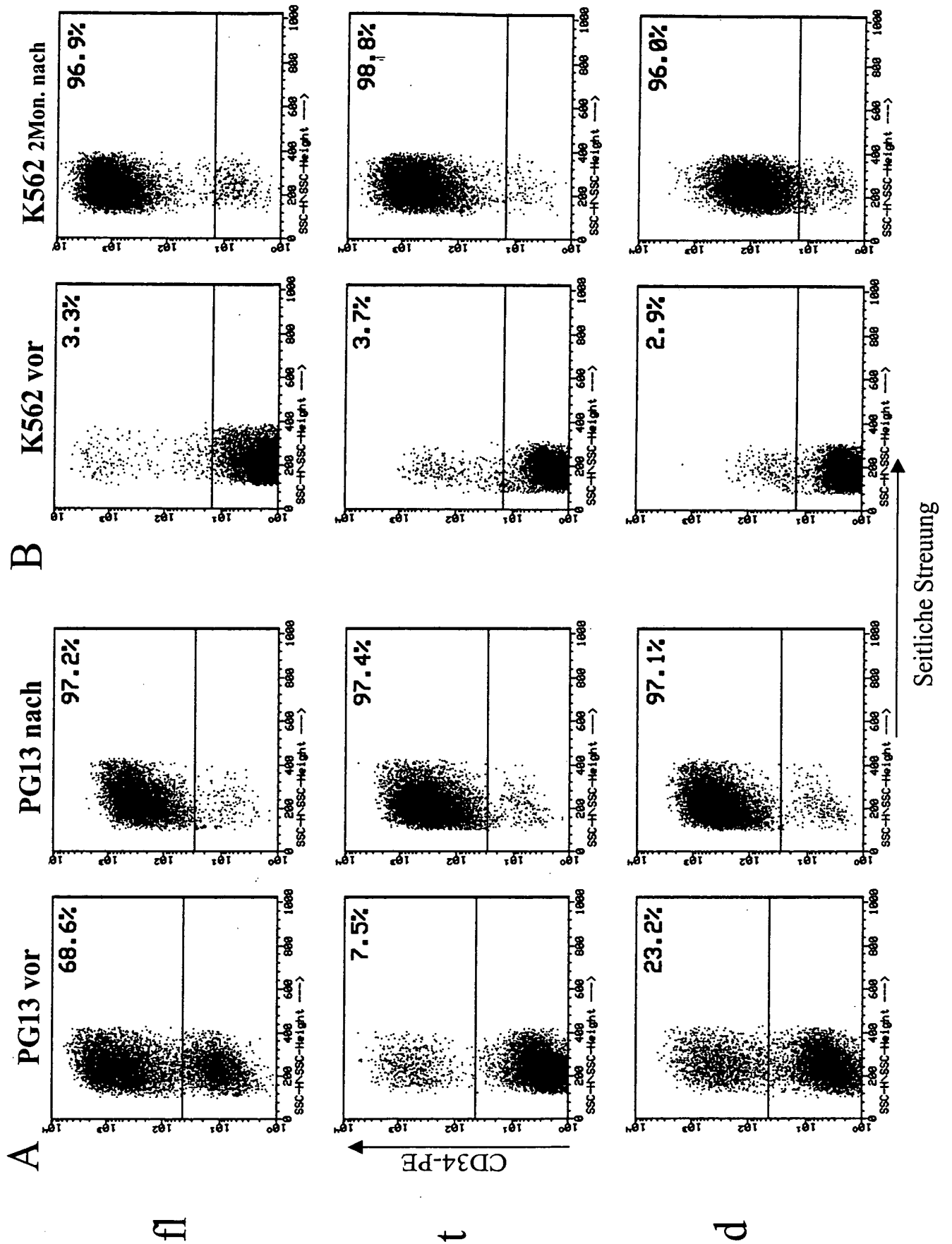
Fragment oder eine Variante desselben nicht natürlicherweise exprimieren.

30. Verwendung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Vektor ist, wie er in den Ansprüchen 12 bis 17 genannt ist.
31. Gentherapeutisches Arzneimittel, enthaltend einen Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5.
32. Gentherapeutisches Arzneimittel, enthaltend T-Lymphozyten, die mit einem Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 5 transfiziert sind.
33. Verwendung einer für das CD34-Oberflächenantigen oder ein Fragment desselben oder eine Variante derselben (Marker) kodierenden Nukleinsäuresequenz (Markergen) zum Nachweis genetisch modifizierter Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäuresequenz in einen für die genetische Modifikation verwendeten Gentransfervektor einbaut, der eine in die Zellen zu transferierende Nukleinsäuresequenz (Transgen) enthält, wobei man das Markergen so auswählt, daß der Marker auf der Oberfläche der mit dem Vektor transfizierten Zellen exprimiert wird, wobei man die transduzierten Zellen durch spezifischen Nachweis des Markers identifiziert.
34. Verwendung einer für das CD34-Oberflächenantigen oder ein Fragment desselben oder eine Variante derselben (Marker) kodierenden Nukleinsäuresequenz (Markergen) zum Nachweis von Zellen, die CD34, ein Fragment oder eine Variante desselben nicht natürlicherweise exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäuresequenz in einen Vektor einbaut, wobei man das Markergen so auswählt, daß der Marker auf der Oberfläche der mit dem Vektor transfizierten Zellen exprimiert wird, wobei man die transduzierten Zellen durch spezifischen Nachweis des Markers identifiziert.

### Zusammenfassung

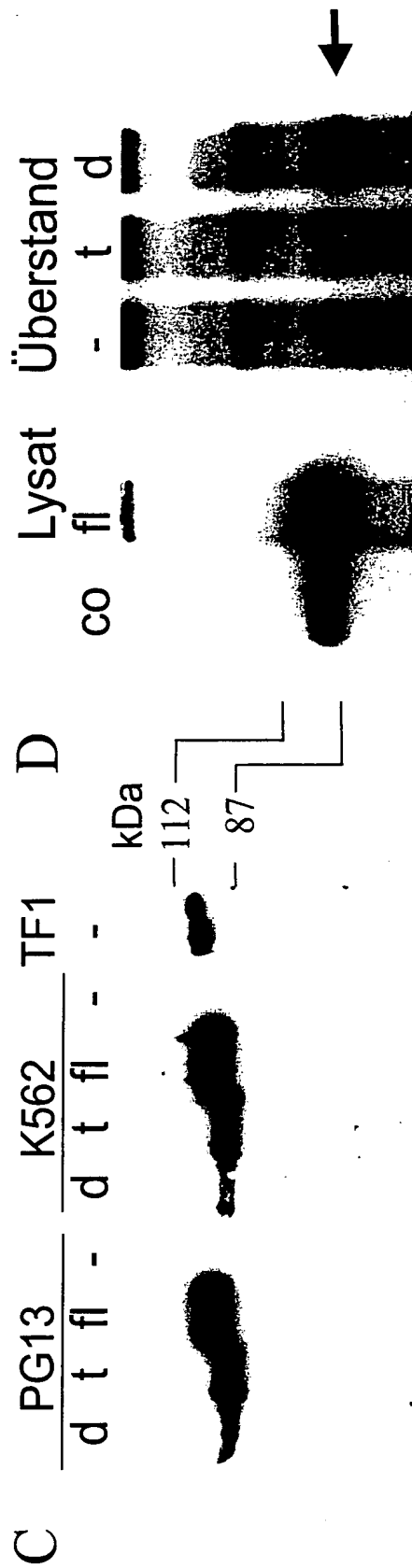
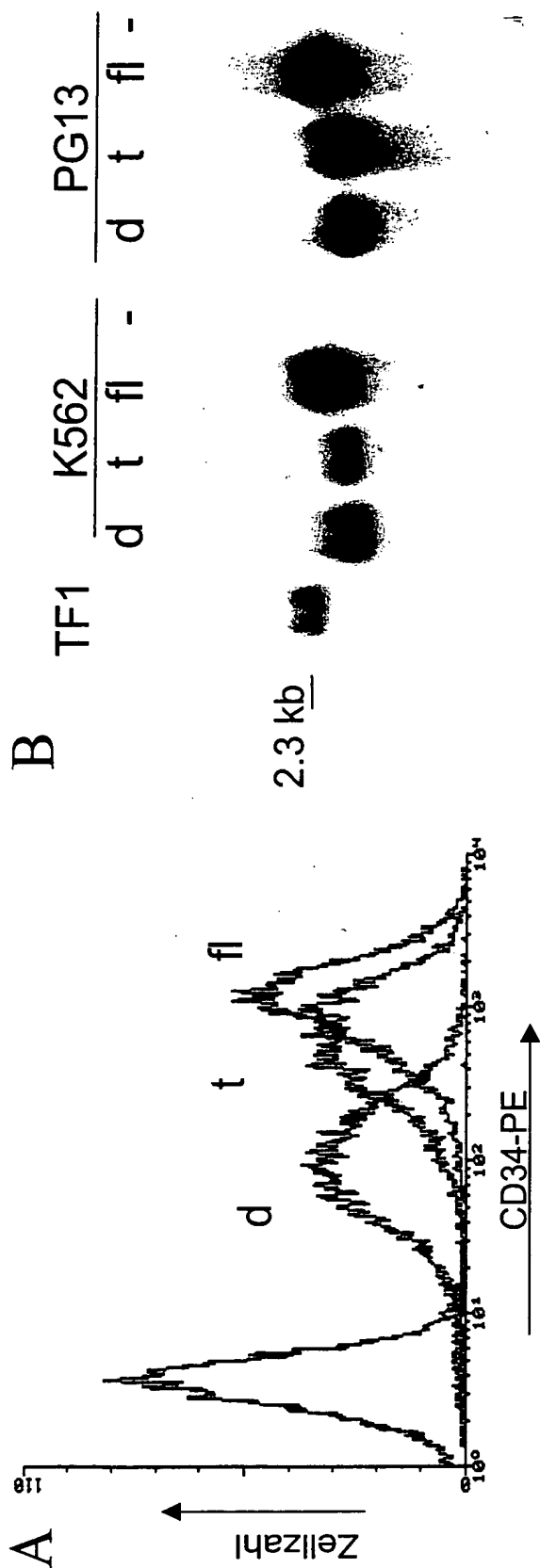
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von CD34 oder einem davon abgeleiteten Polypeptid als Zell-Oberflächen- bzw. Gentransfer-Marker. Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung ein Gentransfervektor sowie mit dem Vektor transfizierte Wirtszellen, wobei der Vektor ein Transgen und eine für CD34, ein Fragment desselben oder eine Variante derselben kodierende Nukleinsäuresequenz enthält. Der Vektor eignet sich besonders zur Anwendung in Verfahren zur Identifizierung und/oder Selektion genetisch modifizierter Zellen und in der Gentherapie. Die Erfindung betrifft daher ferner Kits zur Durchführung dieser Verfahren und die Verwendung des Vektors *in vitro* und *in vivo*.





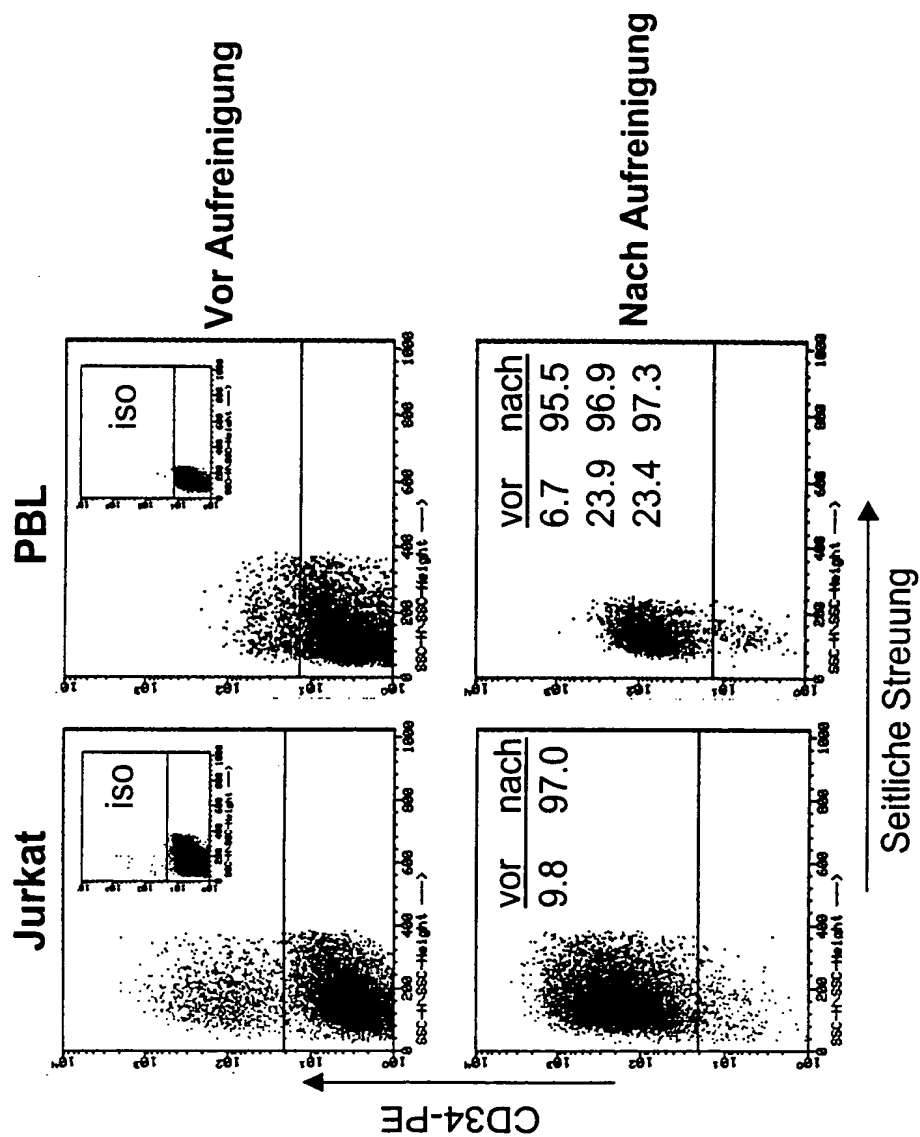


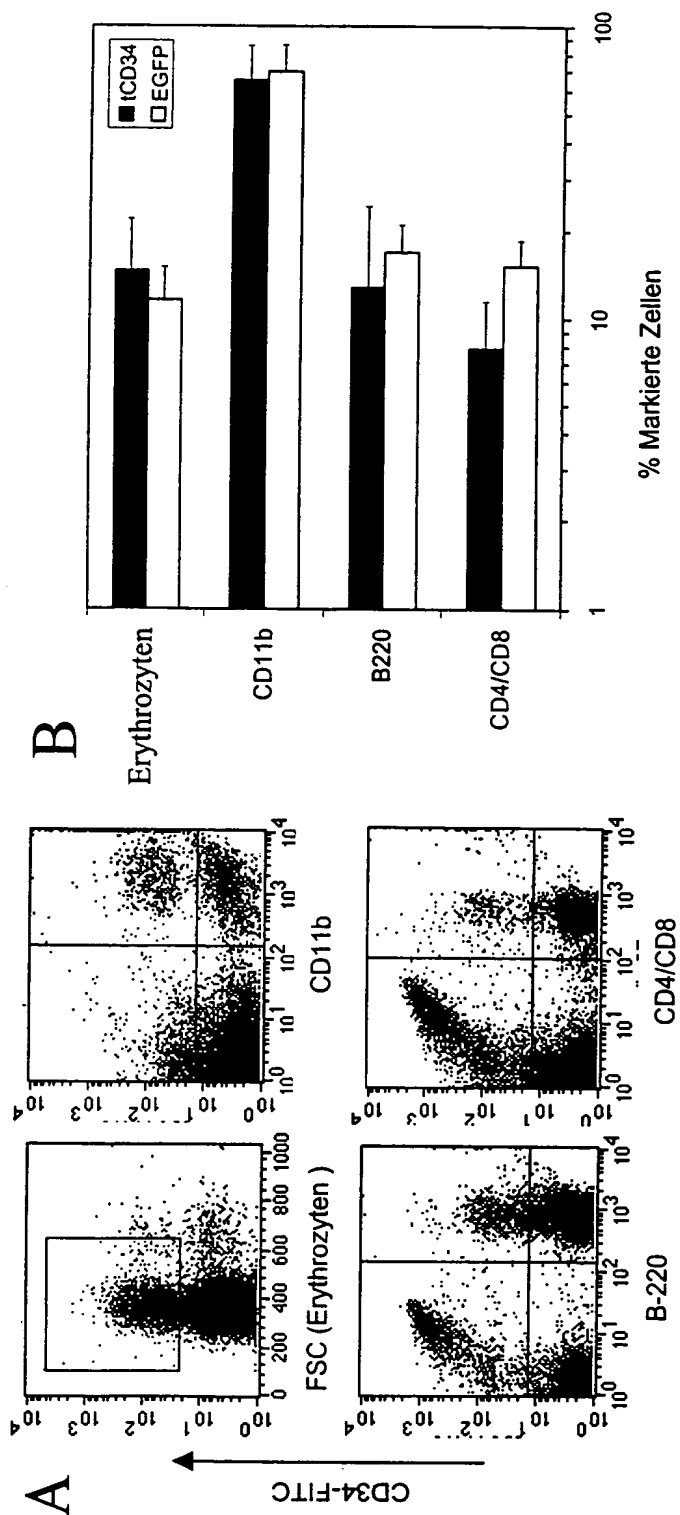
Figur 3



Figur 4

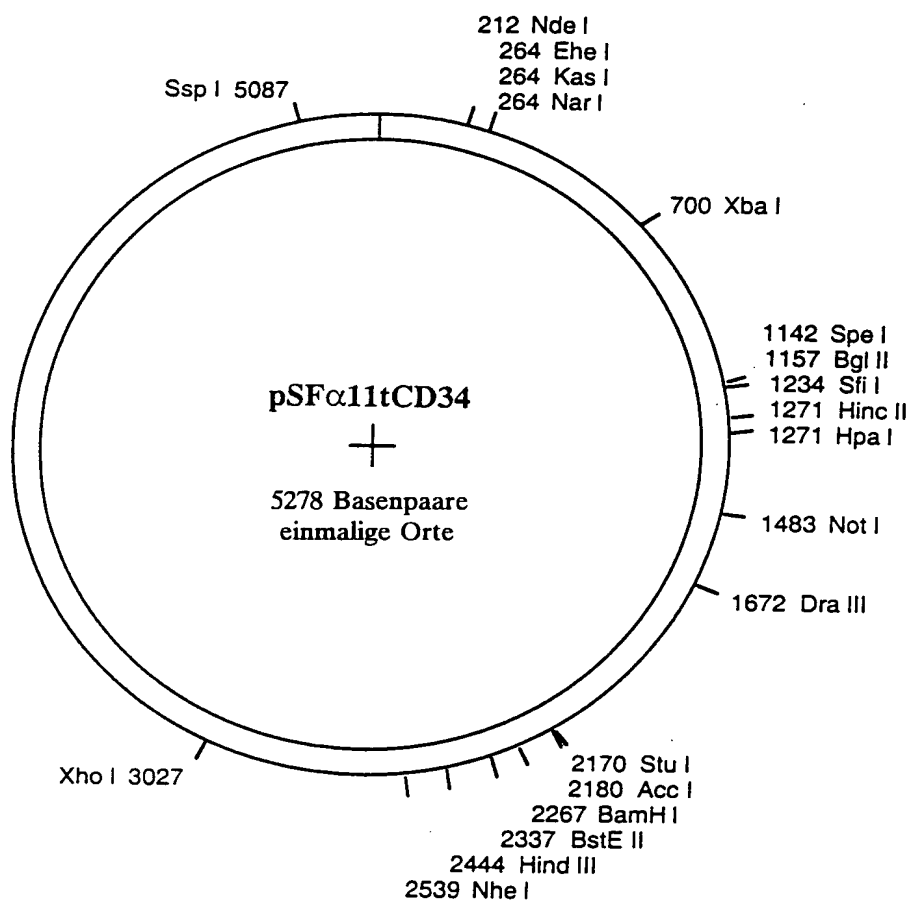
4/6





Figur 6

6/6



# SEQUENZPROTOKOLL

<110> Prof. Dr. Axel R. Zander

<120> Verwendung von CD34 oder einem davon abgeleiteten Polypeptid als Zell-Oberflächen- bzw. Gentransfer-Marker

<130> P053306

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1122)

<223> CD34 (vollstaendige Laenge)

<400> 1

atg	cgc	cgg	ggc	tgg	acc	gcg	ctt	tgc	ttg	ctg	agt	ttg	ctg	cct	tct	48
Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Thr	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	
1				5				10						15		
ggg	ttc	atg	agt	ctt	gac	aac	aac	ggg	act	gct	acc	cca	gag	tta	cct	96
Gly	Phe	Met	Ser	Leu	Asp	Asn	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	
			20					25					30			
acc	cag	gga	aca	ttt	tca	aat	gtt	tct	aca	aat	gta	tcc	tac	caa	gaa	144
Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Tyr	Gln	Glu	
		35					40					45				
act	aca	aca	cct	agt	acc	ctt	gga	agt	acc	agc	ctg	cac	cct	gtg	tct	192
Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	His	Pro	Val	Ser	
		50				55					60					
caa	cat	ggc	aat	gag	gcc	aca	aca	aac	atc	aca	gaa	acg	aca	gtc	aaa	240
Gln	His	Gly	Asn	Glu	Ala	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Thr	Val	Lys	
65					70				75						80	
ttc	aca	tct	acc	tct	gtg	ata	acc	tca	gtt	tat	gga	aac	aca	aac	tct	288
Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	
				85					90					95		
tct	gtc	cag	tca	cag	acc	tct	gta	atc	agc	aca	gtg	ttc	acc	acc	cca	336
Ser	Val	Gln	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Pro	
			100					105					110			
gcc	aac	gtt	tca	act	cca	gag	aca	acc	ttg	aag	cct	agc	ctg	tca	cct	384
Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	
		115					120					125				
gga	aat	gtt	tca	gac	ctt	tca	acc	act	agc	act	agc	ctt	gca	aca	tct	432
Gly	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	
		130				135					140					



<210> 2  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Pro Arg Gly Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro  
 20 25 30  
 Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu  
 35 40 45  
 Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser  
 50 55 60  
 Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys  
 65 70 75 80  
 Phe Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser  
 85 90 95  
 Ser Val Gln Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro  
 100 105 110  
 Ala Asn Val Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro  
 115 120 125  
 Gly Asn Val Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser  
 130 135 140  
 Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Ile Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly  
 165 170 175  
 Ile Cys Leu Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys  
 180 185 190  
 Asp Arg Gly Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala  
 195 200 205  
 Asp Ala Asp Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser  
 210 215 220  
 Glu Val Arg Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Ser Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys  
 245 250 255  
 Lys Leu Gly Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln  
 260 265 270  
 Ser Tyr Ser Gln Lys Thr Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu  
 275 280 285  
 Leu Ala Val Leu Gly Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser  
 290 295 300  
 Trp Ser Pro Thr Gly Glu Arg Leu Gly Glu Asp Pro Tyr Tyr Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Gly Gly Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Pro Gly Thr Ser Pro Glu  
 325 330 335  
 Ala Gln Gly Lys Ala Ser Val Asn Arg Gly Ala Gln Glu Asn Gly Thr  
 340 345 350  
 Gly Gln Ala Thr Ser Arg Asn Gly His Ser Ala Arg Gln His Val Val  
 355 360 365  
 Ala Asp Thr Glu Leu  
 370

<210> 3  
 <211> 951  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(951)  
 <223> CD34 (trunkierte Variante)

<400> 3  
 atg ccg cgg ggc tgg acc gcg ctt tgc ttg ctg agt ttg ctg cct tct 48  
 Met Pro Arg Gly Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser  
 1 5 10 15  
 ggg ttc atg agt ctt gac aac aac ggt act gct acc cca gag tta cct 96  
 Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro  
 20 25 30  
 acc cag gga aca ttt tca aat gtt tct aca aat gta tcc tac caa gaa 144  
 Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu  
 35 40 45  
 act aca aca cct agt acc ctt gga agt acc agc ctg cac cct gtg tct 192  
 Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser  
 50 55 60  
 caa cat ggc aat gag gcc aca aca aac atc aca gaa acg aca gtc aaa 240  
 Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys  
 65 70 75 80  
 ttc aca tct acc tct gtg ata acc tca gtt tat gga aac aca aac tct 288  
 Phe Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser  
 85 90 95  
 tct gtc cag tca cag acc tct gta atc agc aca gtg ttc acc acc cca 336  
 Ser Val Gln Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro  
 100 105 110  
 gcc aac gtt tca act cca gag aca acc ttg aag cct agc ctg tca cct 384  
 Ala Asn Val Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro  
 115 120 125  
 gga aat gtt tca gac ctt tca acc act agc act agc ctt gca aca tct 432  
 Gly Asn Val Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser  
 130 135 140  
 ccc act aaa ccc tat aca tca tct tct cct atc cta agt gac atc aag 480  
 Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys  
 145 150 155 160  
 gca gaa atc aaa tgt tca ggc atc aga gaa gtg aaa ttg act cag ggc 528  
 Ala Glu Ile Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly  
 165 170 175  
 atc tgc ctg gag caa aat aag acc tcc agc tgt gcg gag ttt aag aag 576  
 Ile Cys Leu Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys  
 180 185 190  
 gac agg gga gag ggc ctg gcc cga gtg ctg tgt ggg gag gag cag gct 624  
 Asp Arg Gly Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala  
 195 200 205



gat	gct	gat	gct	ggg	gcc	cag	gta	tgc	tcc	ctg	ctc	ctt	gcc	cag	tct	672
Asp	Ala	Asp	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Gln	Ser	
210						215					220					
gag	gtg	agg	cct	cag	tgt	cta	ctg	ctg	gtc	ttg	gcc	aac	aga	aca	gaa	720
Glu	Val	Arg	Pro	Gln	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Glu	
225					230					235					240	
att	tcc	agc	aaa	ctc	caa	ctt	atg	aaa	aag	cac	caa	tct	gac	ctg	aaa	768
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Leu	Met	Lys	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Leu	Lys	
				245					250					255		
aag	ctg	ggg	atc	cta	gat	ttc	act	gag	caa	gat	gtt	gca	agc	cac	cag	816
Lys	Leu	Gly	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	His	Gln	
			260					265					270			
agc	tat	tcc	caa	aag	acc	ctg	att	gca	ctg	gtc	acc	tcg	gga	gcc	ctg	864
Ser	Tyr	Ser	Gln	Lys	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Leu	
		275					280					285				
ctg	gct	gtc	ttg	ggc	atc	act	ggc	tat	ttc	ctg	atg	aat	cgc	cgc	agc	912
Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Phe	Leu	Met	Asn	Arg	Arg	Ser	
	290					295					300					
tgg	agc	ccc	aca	gga	gaa	agg	ctg	gaa	cta	gaa	cca	tga				951
Trp	Ser	Pro	Thr	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Leu	Glu	Pro					
305					310					315						

<210> 4  
 <211> 316  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Thr	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser
1				5					10					15	
Gly	Phe	Met	Ser	Leu	Asp	Asn	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro
			20					25				30			
Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Tyr	Gln	Glu
		35					40				45				
Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	His	Pro	Val	Ser
	50					55				60					
Gln	His	Gly	Asn	Glu	Ala	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Thr	Val	Lys
65				70					75					80	
Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser
			85					90				95			
Ser	Val	Gln	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Pro
		100					105				110				
Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro
		115					120				125				
Gly	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser
	130					135				140					
Pro	Thr	Lys	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Ile	Lys
145					150				155					160	
Ala	Glu	Ile	Lys	Cys	Ser	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly
			165					170					175		
Ile	Cys	Leu	Glu	Gln	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Cys	Ala	Glu	Phe	Lys	Lys
			180					185				190			
Asp	Arg	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Cys	Gly	Glu	Glu	Gln	Ala
		195					200					205			

Asp	Ala	Asp	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Gln	Ser
210						215					220				
Glu	Val	Arg	Pro	Gln	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Glu
225					230					235					240
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Leu	Met	Lys	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Leu	Lys
				245					250					255	
Lys	Leu	Gly	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	His	Gln
				260				265					270		
Ser	Tyr	Ser	Gln	Lys	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Leu
		275					280					285			
Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Phe	Leu	Met	Asn	Arg	Arg	Ser
290						295					300				
Trp	Ser	Pro	Thr	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Leu	Glu	Pro				
305					310					315					

<210> 5  
 <211> 906  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(906)  
 <223> CD34 (deletierte Variante)

<400> 5																
atg	ccg	cgg	ggc	tgg	acc	gcg	ctt	tgc	ttg	ctg	agt	ttg	ctg	cct	tct	48
Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Thr	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	
1				5				10						15		
ggg ttc atg agt ctt gac aac aac ggt act gct acc cca gag tta cct																96
Gly	Phe	Met	Ser	Leu	Asp	Asn	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	
			20					25					30			
acc cag gga aca ttt tca aat gtt tct aca aat gta tcc tac caa gaa																144
Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Tyr	Gln	Glu	
		35					40				45					
act aca aca cct agt acc ctt gga agt acc agc ctg cac cct gtg tct																192
Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Ser	Leu	His	Pro	Val	Ser	
		50				55					60					
caa cat ggc aat gag gcc aca aca aac atc aca gaa acg aca gtc aaa																240
Gln	His	Gly	Asn	Glu	Ala	Thr	Thr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Thr	Val	Lys	
65					70					75					80	
ttc aca tct acc tct gtg ata acc tca gtt tat gga aac aca aac tct																288
Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	
				85					90					95		
tct gtc cag tca cag acc tct gta atc agc aca gtg ttc acc acc cca																336
Ser	Val	Gln	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Pro	
			100					105					110			
gcc aac gtt tca act cca gag aca acc ttg aag cct agc ctg tca cct																384
Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	
		115					120					125				

gga aat gtt tca gac ctt tca acc act agc act agc ctt gca aca tct	432
Gly Asn Val Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser	
130 135 140	
ccc act aaa ccc tat aca tca tct tct cct atc cta agt gac atc aag	480
Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys	
145 150 155 160	
gca gaa atc aaa tgt tca ggc atc aga gaa gtg aaa ttg act cag ggc	528
Ala Glu Ile Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly	
165 170 175	
atc tgc ctg gag caa aat aag acc tcc agc tgt gcg gag ttt aag aag	576
Ile Cys Leu Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys	
180 185 190	
gac agg gga gag ggc ctg gcc cga gtg ctg tgt ggg gag gag cag gct	624
Asp Arg Gly Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala	
195 200 205	
gat gct gat gct ggg gcc cag gta tgc tcc ctg ctc ctt gcc cag tct	672
Asp Ala Asp Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser	
210 215 220	
gag gtg agg cct cag tgt cta ctg ctg gtc ttg gcc aac aga aca gaa	720
Glu Val Arg Pro Gln Cys Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu	
225 230 235 240	
att tcc agc aaa ctc caa ctt atg aaa aag cac caa tct gac ctg aaa	768
Ile Ser Ser Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys	
245 250 255	
aag ctg ggg atc cta gat ttc act gag caa gat gtt gca agc cac cag	816
Lys Leu Gly Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln	
260 265 270	
agc tat tcc caa aag acc ctg att gca ctg gtc acc tcg gga gcc ctg	864
Ser Tyr Ser Gln Lys Thr Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu	
275 280 285	
ctg gct gtc ttg ggc atc act ggc tat ttc ctg atg aat tga	906
Leu Ala Val Leu Gly Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn	
290 295 300	

<210> 6  
 <211> 301  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Pro Arg Gly Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro  
 20 25 30  
 Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu  
 35 40 45  
 Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser  
 50 55 60  
 Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys  
 65 70 75 80

Phe	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser
				85					90					95	
Ser	Val	Gln	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Pro
			100					105					110		
Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro
		115					120					125			
Gly	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser
	130					135					140				
Pro	Thr	Lys	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Ile	Lys
145					150					155					160
Ala	Glu	Ile	Lys	Cys	Ser	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly
				165					170					175	
Ile	Cys	Leu	Glu	Gln	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Cys	Ala	Glu	Phe	Lys	Lys
			180					185					190		
Asp	Arg	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Cys	Gly	Glu	Glu	Gln	Ala
		195					200					205			
Asp	Ala	Asp	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Gln	Ser
	210					215					220				
Glu	Val	Arg	Pro	Gln	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Glu
225					230					235					240
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Leu	Met	Lys	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Leu	Lys
				245					250					255	
Lys	Leu	Gly	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Ser	His	Gln
			260					265					270		
Ser	Tyr	Ser	Gln	Lys	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Leu
		275					280						285		
Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Phe	Leu	Met	Asn			
	290					295					300				

<210> 7  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Kuenstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der kuenstlichen Sequenz: Primer CD34fw

<400> 7  
 aaggaaaaaa gcggccgcca tgccgcgggg ctggac

36

<210> 8  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Kuenstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der kuenstlichen Sequenz: Primer CD34rev

<400> 8  
 taagcttatc acaattcggt atcagccacc a

31

<210> 9  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Kuenstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der kuenstlichen Sequenz: Primer CD34lrev

<400> 9  
caataagctt atcatgggtc tagttccagc ctttctcct gtggggct 48

<210> 10  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Kuenstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der kuenstlichen Sequenz: Primer CD34srev

<400> 10  
caataagctt atcaattcat caggaaatag ccag 34